# บทที่ 2

## อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

<u>เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) ของ New Brunswick Co., U.S.A.

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer,spectronic 21) ของBausch and Lomb,U.S.A.

3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น 240 ของ Corning, U.S.A.

4. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของ Sartorius, U.S.A.

5. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ของ Tomy Seiko Co., LTD., Japan.

6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-Top Centrifuge) รุ่น H-103 N series ของ Kokusan,Japan

7. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 Beckman,U.S.A.

8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ของ Memmert, Germany

9. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow ของ ISSCO รุ่น J2-21, U.S.A.

10. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo Electronic Co., Ltd., Japan

11. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHK ของ Olympus, Japan

12. เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldatherm) ของ Gerhardt, Germany

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (xylan from oat spelts)
2. พารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside)
3. พารา-ไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol)
4. ดีออกซีไรโบนิวคลีอิค แอซิด (deoxyribonucleic acid) จาก Calf Thymus Type 1
5. โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)
6. อลูมินา (alumina type A5)
7. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate)

ทั้งหมดจาก Sigma,U.S.A.

1 การแยก (isolation) *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดิน

1.1 นำตัวอย่างดินประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล. ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) เจือจางเป็นอนุกรมแล้วดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล. ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนฮิวมิค แอซิด วิตามิน-อการ์ มีเดียม (Humic Acid-Vitamin Agar Medium, HV agar) ( Hayakawa and Nonomura, 1987,ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) ที่มีผิวหน้าแห้งพอเหมาะ จากนั้นกระจาย (spread) สารแขวนลอยดินให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

1.2 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นานประมาณ 7 วัน จะพบโคโลนีของ *Streptomyces* จากนั้นเขี่ยแต่ละโคโลนีมาทำให้บริสุทธิ์ โดยลากเชื้อบนอาหารแข็งชนิด MS ( MS agar, ภาคผนวก ก.หมายเลข 2 ) ที่เติมไซโคลเฮกซิมีดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล.

1.3 แยกเอาโคโลนี *Streptomyces* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 2 ไปเก็บในอาหารเอียงแข็ง( agar slant ) ชนิด MS ( ภาคผนวก ก หมายเลข 2 ) เพื่อใช้ในการตรวจสอบขั้นต่อไป

2 การเก็บรักษาเชื้อ *Streptomyces* spp.

ลากสปอร์ของ *Streptomyces* ลงบนอาหารแข็งเอียงชนิด MS (ภาคผนวก ก.หมายเลข2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 วันหรือจนโคโลนีสร้างสปอร์แก่เต็มที่ จึงนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3 การเตรียมสปอร์

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. ในอาหารแข็งเอียงชนิด MS ( ภาคผนวก ก หมายเลข 2 ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จึงนำมาขูดสปอร์ออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวทำละลาย ดูดสปอร์แขวนลอยออกมากรองผ่านชุดกรองสปอร์เพื่อกำจัดสายใย ( ภาคผนวก ค หมายเลข 1 ) และนำสปอร์ที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของน้ำใสทิ้งไปจากนั้นแขวนลอยใน 20 % กลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ให้มีความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ $10^8$ สปอร์ต่อมล. นำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4 การเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดส ในอาหารเหลว(liquid medium)

เลี้ยง *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Nakanishi และคณะ (1984 ) โดยเขี่ยเชื้อ *Streptomyces* spp.ที่มีอายุประมาณ 7-10 วัน จำนวน 1-2 ลูป ใส่ลงในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. ที่บรรจุขดลวดสปริงอยู่ภายในและมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตามภาคผนวก ก. หมายเลข 3 ปริมาตร 25 มล. บรรจุอยู่ นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิชนิด rotary shakerด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน กรองแยกเซลล์และส่วนน้ำใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4. นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งจะเรียกว่า crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีไซแลเนสตามวิธีในข้อ 6.1 หน้า 28 ล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาเตรียมเพื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตาไซโลสิเดส ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Nakanishi และคณะ (1987) โดยนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยการบดกับผงอลูมินา ( alumina ) ในโกร่งด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้น

เติม 5 มล. ของ 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ลงไปเป็นตัวทำละลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตาไซโลสิเดสและปริมาณโปรตีน

5 เตรียมเอนไซม์ไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดสเพื่อศึกษาสมบัติเบื้องต้น

5.1 การเตรียมไซแลเนสเข้มข้นโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* ที่ต้องการศึกษาสมบัติของไซแลเนสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสทั้งหมดมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 % ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากน้ำใสด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมดไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ นำไปปั่นแยกส่วนตะกอนออกด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที ส่วนใสที่ได้คือไซแลเนสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว

5.2 การเตรียมบีตาไซโลสิเดส

กรองเซลล์ *Streptomyces* ที่ต้องการศึกษาสมบัติของบีตาไซโลสิเดสด้วยกระดาษกรองชนิด Whatman เบอร์ 4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเซลล์มาเตรียมบีตาไซโลสิเดสโดยนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยการบดกับผงอลูมินา (alumina) ในโกร่งด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 5 มล. ของ 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ลงไปเป็นตัวทำละลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตาไซโลสิเดสและปริมาณโปรตีน

6 การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดส

6.1 การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส

เป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakajima และคณะ (1984) ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

ก. สารละลายไซแลนความเข้มข้น 10 มก.ต่อ มล. ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์อะซิเทตบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 0.3 มล.

ข. 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 2.4 มล.

ค. crude enzyme หรือไซแลเนสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เจือจางด้วย 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 จนมีความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 0.3 มล.นำส่วนผสมทั้งหมดนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาทีเก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0 และ10 นาที ครั้งละ 1 มล. หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นจึงนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีการของ Somogyi Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1944)

1 หน่วยของไซแลเนสเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

6.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของบีตาไซโลสิเดส

เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (1987) ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 มล.ของ 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์(p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside) ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 6.5 และสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 0.5 มล. นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล. ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา ปั่นผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้พาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมล.

1 หน่วยของบีตาไซโลสิเดสเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์แล้วได้พาราไนโตรฟีนอล เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมอัลคาไลน์คอปเปอร์ รีเอเจนท์ (Alkali Copper Reagent, วิธีเตรียมในภาคผนวก ข. หมายเลข 1.1) ปริมาตร 1 มล.ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาทีและทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็นจัดจากนั้นเติม เนลสัน รีเอเจนท์ (Nelson Reagent,ภาคผนวก ข. หมายเลข 1.2 ) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงเติมน้ำกลั่น 5 มล. นำส่วนผสมที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลไซโลส ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีปริมาณโปรตีนความเข้มข้นเหมาะสมปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย C ( ภาคผนวกข. หมายเลข 2.3 ) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 20 นาที จึงเติมสารละลายผสม D (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2.4)ปริมาตร 0.5 มล. ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที จึงนำส่วนผสมนี้ไปวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล.

9 การเตรียมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp

9.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ กากเมล็ดฝ้าย นำกากเมล็ดฝ้ายมากำจัดลิกนินโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 % ให้ได้กากเมล็ดฝ้ายเข้มข้น 10 % (w/v) เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง (Detroy *et al.*, 1981) จากนั้นกรองและล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 แล้วจึงนำไปอบแห้งบดให้ละเอียดเก็บไว้ใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

9.2 การเตรียมแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนในงานวิจัยนี้คือ กากถั่วเหลือง นำกากถั่วเหลืองปริมาณ 200 กรัมมาย่อยด้วยกรดซัลฟูริกโดยเติมกรดเข้มข้น 1 นอร์มอลปริมาตร 600 มล. แล้วนึ่งที่ 121 องศา-เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 40 นาที นำมาเติมน้ำกลั่น 1200 มล.ผสมให้เข้ากันและกรองด้วยผ้าขาวบาง เอาส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล จากนั้นกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำไปหาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl และแบ่งบางส่วนไปหาน้ำหนักแห้งเพื่อเทียบเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (nitrogen content) ด้วยวิธี Kjeldahl (Stayermark,1951) ดังนี้

นำตัวอย่างปริมาตร 1-3 มล. ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มล. เติมซอลท์มิกเจอร์ (saltmixture) 7 กรัม ( ซึ่งประกอบด้วยไดโปแทสเซียมซัลเฟต ($K_2SO_4$) และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ในอัตราส่วน 19:1) ค่อยๆเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นปริมาตร 15 มล.ลงไป จากนั้นนำไปย่อยบนเตาหลุม (digester) ในตู้ควันจนได้สารละลายใส นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อน จึงค่อยๆเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ลงไป จากนั้นนำไปกลั่นบนเตากลั่นโดยดักจับแอมโมเนีย ($NH_3$) ที่เกิดขึ้นด้วยกรดบอริค ($H_3BO_3$) เข้มข้น 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ ( ภาคผนวกหมายเลข 4 ) ผสมอยู่ 3 หยด กลั่นจนสารละลายบอริคมีปริมาตร 200 มล. จึงนำสารละลายที่ได้มาไตเตรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริค (HCl) มาตรฐาน ที่ทราบ.

ความเข้มข้นแน่นอนแล้วและคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{A \times B \times 1.4}{C}$$

A = ปริมาตรกรด HCl (มล.)

B = ความเข้มข้นของกรด HCl (M)

C = ปริมาตรสารตัวอย่าง (มล.)

10 การศึกษาสมบัติของไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดส

10.1 การศึกษาสมบัติของไซแลเนส

10.1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มไซแลเนสปริมาณ 25.8 ไมโครกรัมโปรตีน ในสารผสมปฏิกิริยาที่มีองค์ประกอบ ดังกล่าวในข้อ 6.1 หน้า 28 โดยผันแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 45- 80 องศาเซลเซียส

10.1.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มไซแลเนสปริมาณ 25.8 ไมโครกรัมโปรตีนในสารผสมปฏิกิริยาที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในข้อ 10.1.1 ยกเว้นแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็น 4.0-6.5 โดยใช้ อะซิเทต บัฟเฟอร์ ( acetate buffer ) 6.5-8.0 โดยใช้ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) และ 8.0-9.5 โดยใช้ ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (tris-hydrochloride buffer) และบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส

10.1.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มไซแลเนสที่เตรียมได้ปริมาณ 25.8 ไมโครกรัมโปรตีนตามวิธีในหน้า 28 ใน 0.1โมลาร์อะซิเทต บัฟเฟอร์ (acetatebuffer) pH 5.5 ที่อุณหภูมิในช่วง 45 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาหาแอคติวิตีของไซแลเนสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 6.1 หน้า 28 ยกเว้นเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็น 60 องศาเซลเซียส โดยมีเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

10.1.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มไซแลเนสปริมาณ 120 ไมโครกรัมโปรตีนใน 10 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆเช่นเดียวกับที่ใช้ในข้อ 10.1.2 เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำมาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือตามวิธีการในหน้า 28 โดยปรับ pH ให้เป็น 5.5 โดยการเจือจางเอนไซม์อย่างน้อย 10 เท่า ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 5.5 และมีเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

10.2. <u>การศึกษาสมบัติของบีตาไซโลสิเดส</u>

10.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มบีตาไซโลสิเดส 10.0 ไมโครกรัมโปรตีน ในสารผสมปฏิกิริยาซึ่งมีองค์ประกอบดังข้อ 6.2 หน้า 28 ผันแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มช่วง 35-70 องศาเซลเซียส

10.2.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มบีตาไซโลสิเดส 10 ไมโครกรัมโปรตีน ตามวิธีการในข้อ 10.2.1 ยกเว้นแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็น 4.0-6.5 โดยใช้ อะซิเทต บัฟเฟอร์ ( acetate buffer ) 6.5-8.0 โดยใช้ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) และ 8.0-9.5 โดยใช้ ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (tris-hydrochloride buffer) และบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส

10.2.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มบีตาไซโลสิเดส 10.0 ไมโครกรัมโปรตีนใน 0.1โมลาร์อะซิเทต บัฟเฟอร์(acetate buffer) pH 6.5 ที่อุณหภูมิในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมาหาแอคติวิตีของบีตาไซโลสิเดสที่เหลือ ตามวิธีการในข้อ 6.2 หน้า 28 โดยมีเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

10.2.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มบีตาไซโลสิเดส 58 ไมโครกรัมโปรตีน ใน 10 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับที่ใช้ในข้อ 10.2.2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำมาหา แอคติวิตีของบีตาไซโลสิเดสที่เหลืออยู่ตามวิธีการในข้อ 10.2.3 โดยปรับ pH ให้เป็น 6.5 โดยเจือจางอย่างน้อย 10 เท่า ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเทต บัฟเฟอร์ pH 6.5และมีเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย